

Docket No.: KSM-0216
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Hirotaka Uefuji, et al.

Application No.: NEW APPLICATION

Group Art Unit: N/A

Filed: July 22, 2003

Examiner: Not Yet Assigned

For: COMPOSITE UTILIZATION OF A GROUP OF GENES
IN BIOSYNTHETIC PATHWAY OF CAFFEINE

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

MS Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-213655	July 23, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith. Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 18-0013, under Order No. from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: July 22, 2003

Respectfully submitted,


By David T. Nikaido

Registration No.: 22,663
RADER, FISHMAN & GRAUER PLLC
1233 20th Street, N.W., Suite 501
Washington, DC 20036
(202) 955-3750
Attorney for Applicant

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 7月23日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-213655

[ST.10/C]:

[JP2002-213655]

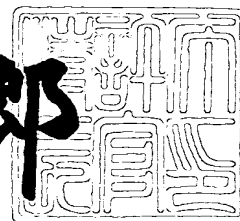
出 願 人
Applicant(s):

奈良先端科学技術大学院大学長
株式会社豊田中央研究所

2003年 6月25日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3050135

【書類名】 特許願

【整理番号】 P020373

【提出日】 平成14年 7月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究調査センター内 バイオテクノロジー開発技術研究組合内

【氏名】 上藤 洋敬

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター内

【氏名】 佐野 浩

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター内

【氏名】 小泉 望

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科内

【氏名】 新名 惇彦

【特許出願人】

【持分】 060/100

【識別番号】 598169457

【氏名又は名称】 奈良先端科学技術大学院大学長

【特許出願人】

【持分】 040/100

【識別番号】 000003609

【氏名又は名称】 株式会社豊田中央研究所

【代理人】

【識別番号】 100060874

【弁理士】

【氏名又は名称】 岸本 瑛之助

【選任した代理人】

【識別番号】 100079038

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 彰

【選任した代理人】

【識別番号】 100083149

【弁理士】

【氏名又は名称】 日比 紀彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100069338

【弁理士】

【氏名又は名称】 清末 康子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002820

【納付金額】 8,400円

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合40/100, 国等の
委託研究成果に係る特許出願（平成13年度植物利用エ
ネルギー使用合理化工業原料生産技術の研究開発）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 カフェイン生合成系遺伝子群の複合利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の酵素(a) (c) (d) 及び細胞抽出物(b) の 2 つ以上の組み合わせの触媒作用の下に、生体外で、プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化、プリン環の 9 位での 7-メチルキサントシンの脱リボース化、プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化、及び／又は、プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を行うことによって、7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェインを生産する方法。

(a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有する酵素、

(b) プリン環の 9 位での 7-メチルキサントシンの脱リボース化を触媒する活性を有し、大腸菌から得られる細胞粗抽出物、

(c) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：4 に示すアミノ酸配列を有する酵素、

(d) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：7 に示すアミノ酸配列を有する酵素。

【請求項 2】 酵素(a) (c) (d) 及び細胞抽出物(b) の少なくとも 1 つをこれらと同等の活性を有するものと代替する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 下記の DNA 分子(a) (b) (c) の(a) +(b) の組み合わせ又は(a) +(b) +(c) の組み合わせを、キサントシンを生合成しかつ 7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法。

(a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：2 に示す塩基配列を有する DNA 分子、

(b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5 に示す塩基配列を有する DNA 分子、

(c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配

列表の配列番号：8に示す塩基配列を有するDNA 分子。

【請求項4】 下記のDNA 分子(b) と(c) の組み合わせを、7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法。

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5に示す塩基配列を有するDNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：8に示す塩基配列を有するDNA 分子。

【請求項5】 下記のDNA 分子(a) (b) (c) の2つ以上の組み合わせを、テオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させ、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変する方法。

(a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：2に示す塩基配列を有するDNA 分子、

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5に示す塩基配列を有するDNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：8に示す塩基配列を有するDNA 分子。

【請求項6】 DNA 分子(a) (b) (c) の少なくとも1つをこれらと同等の機能を有するもので代替する請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 下記のRNA 分子(a) (b) (c) の(a) +(b) の組み合わせ又は(a) +(b) +(c) の組み合わせを、キサントシンを生合成しかつ7-メチルキサンチン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法。

(a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：3に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：6に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9に示す塩基配列を有するRNA 分子。

【請求項 8】 下記の RNA 分子 (b) と (c) の組み合わせを、7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法。

(b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：6 に示す塩基配列を有する RNA 分子、

(c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9 に示す塩基配列を有する RNA 分子。

【請求項 9】 下記の RNA 分子 (a) (b) (c) の 2 つ以上の組み合わせを、テオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させ、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変する方法。

(a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：3 に示す塩基配列を有する RNA 分子、

(b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：6 に示す塩基配列を有する RNA 分子、

(c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9 に示す塩基配列を有する RNA 分子。

【請求項 10】 RNA 分子 (a) (b) (c) の少なくとも 1 つをこれらと同等の機能を有するもので代替する請求項 7～9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】 宿主生物が植物であり、テオブロミン又はカフェインを生産又は増産することによって宿主植物を草食動物の食害から防御する、請求項 3～10 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】

本発明は、キサントシンから 7-メチルキサントシン、7-メチルキサンチン、テオブロミンを経てカフェインが生合成される一連の反応系の各工程を触媒するキサントシンメチル化酵素、7-メチルキサンチンメチル化酵素（テオブロミン合成酵素）及び 3, 7-ジメチルキサンチンメチル化酵素（カフェイン合成酵素）、及びこれら酵素をコードする複数のカフェイン生合成系遺伝子の複合的な

利用方法、すなわち上記複数の酵素を2以上組み合わせて用いる方法、及び上記複数のカフェイン生合成系遺伝子を2以上組み合わせて用いる方法に関する。

【0002】

【発明の背景】

カフェインはコーヒーノキ (*Coffea*)、チャノキ (*Camellia sinensis*)、コラ (*Cola acuminata*) 及びマテ (*Ilex paraguariensis*) などの植物種において生合成されるプリンアルカロイドである。カフェインは中枢神経興奮作用などの様々な薬理作用を有するため医薬品として広く利用されている。また、この化合物は昆虫などに対する摂食忌避効果や殺虫効果を有するため、農薬として利用され得る可能性が示唆されている。

【0003】

現在、カフェインは上記の植物から抽出するか化学合成することによって製造されている。そこで、より安価で大規模にカフェインを供給するために、遺伝子組換え技術を利用して、本来カフェインを生合成しない微生物又は植物にカフェインを生産させる技術を開発することが望まれている。また、植物においてカフェインを生産させる技術は、植物を直接的に草食動物の食害から防御するための方法としても期待される。

【0004】

【従来の技術】

コーヒーノキやチャノキでは、アデニンヌクレオチド及びグアニンヌクレオチドの異化代謝中間産物であるキサントシンを出発材料として、7-メチルキサントシン、7-メチルキサンチン、テオブロミンを経てカフェインが生合成される(図1)。この一連の反応はキサントシンメチル化酵素、7-メチルキサントシン脱リボース化酵素、テオブロミン合成酵素及びカフェイン合成酵素によって触媒される。テオブロミン合成酵素をコードするCaMXMT cDNA は既にコーヒーノキから単離されている(Ogawa et al., J. Biol. Chem., 276, 8213-8218(2001)参照)。また、特開2001-37490号公報では、7-メチルキサンチン→テオブロミン→カフェインの2段階のメチル化反応を触媒するメチル化酵素のアミノ酸配列及びこれをコードする塩基配列が記載されている。更に、同公報ではメチルキサン

チン類（7-メチルキサンチン、パラキサンチン、テオブロミン及びカフェイン）を生合成する植物において、該塩基配列を有するDNAを導入することによって、メチルキサンチン類の組成を改変する方法が記載されている。しかしながら、本来メチルキサンチン類を生合成できない生物種においてこれらの化合物を生産させる技術は、未だ知られていない。

【0005】

【発明の課題】

本発明はキサントシンから7-メチルキサントシン、7-メチルキサンチン、テオブロミンを経てカフェインが生合成される一連の反応において、これらの反応をそれぞれ触媒する酵素、及びこれら酵素をそれぞれコードする遺伝子の複合的な利用方法を提供することを目的とする。例えば、本発明によって以下の目的を達成することが可能になる。(1) 上記一連のカフェイン生合成反応系の各工程をそれぞれ触媒する複数の酵素を2以上組み合わせて用いてキサントシンからメチルキサンチン類（7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェイン）を生産する。(2) 本来メチルキサンチン類を生合成しない生物の代謝を改変して、これらの化合物を生産させる。(3) 上記(2)の方法により、植物を草食動物による食害から防御する。

【0006】

【課題の解決手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく研究を重ねた結果、つぎの知見を得た。まず、配列表の配列番号：2、5及び8に示す塩基配列を有するDNA断片をPCRにより増幅した。次に、これらのDNA断片を発現ベクターに組み込んだ後、得られた組換えベクターを大腸菌に導入し、当該DNAに由来する組換えタンパク質を大量に発現させた。この組換えタンパク質を粗抽出又は精製して、その酵素学的性質を調べたところ、配列番号：2に由来するものはキサントシンのメチル化による7-メチルキサントシンの生成反応を触媒することを認め、配列番号：5に由来するものは7-メチルキサンチンのメチル化によるテオブロミンの生成反応を触媒することを認め、配列番号：8に由来するものはテオブロミンのメチル化によるカフェインの生成反応を触媒することを認めた。すなわち、当該DNA群

はそれぞれ、キサントシンメチル化酵素、テオブロミン合成酵素及びカフェイン合成酵素をコードすることが確認された。また、大腸菌の細胞抽出物は 7-メチルキサントシンの脱リボース化による 7-メチルキサンチンの生成反応を触媒することを認めた。すなわち、本来メチルキサンチン類を生合成しない大腸菌の細胞抽出物も 7-メチルキサントシン脱リボース化酵素（7-メチルキサントシン加水分解酵素又は 7-メチルキサントシン加リン酸分解酵素）活性を有することが認められた。更に、上記の 3 種類の組換えタンパク質と大腸菌細胞抽出物の混合物はキサントシンからカフェインへの生成反応を触媒することを認めた。すなわち、3 つの当該メチル化酵素活性と 1 つの当該脱リボース化酵素活性を用いて、生体外すなわち無細胞系において、カフェイン生合成経路を再構成できる、すなわち人工的に構成できることが確認された。

【 0 0 0 7 】

上記のカフェイン生合成経路の再構成に用いる酵素及び細胞抽出物は、これらと同等の活性を有するものであればいずれの生物に由来するものであっても適用し得る。例えば、コーヒーノキ由来のテオブロミン合成酵素とカフェイン合成酵素の代わりに、特開 2001-37490 号公報に記載されている、チャノキ由来の 7-メチルキサンチン→テオブロミン→カフェインの 2 段階のメチル化反応を触媒するメチル化酵素を利用することができる。

【 0 0 0 8 】

また、カフェイン生合成経路の再構成は、上記の酵素及び細胞抽出物を用いて無細胞系で行うだけでなく、これらの酵素をコードする遺伝子をいずれかの生物種へ導入した形質転換生物系においても行うことができる。カフェイン生合成の出発材料となるキサントシンはプリンヌクレオチド異化代謝の中間産物として、コーヒーノキやチャノキのみならず、広範囲の生物種において存在している。また、プリンヌクレオシド脱リボース化酵素は一般的に特定のプリンヌクレオシド誘導体だけでなく、様々なプリンヌクレオシド誘導体に対しても反応することが知られており (Guranowski, Plant Physiol., 70, 344-349 (1982); Parkin, J. Biol. Chem., 271, 21713-21719 (1996); Ogawa et al., Appl. Environ. Microbiol., 67, 1783-1787 (2001) 参照)、7-メチルキサントシンの脱リボース

化反応は生物一般が有しているプリンヌクレオシド脱リボース化酵素によって触媒され得ると考えられる。このことは、本来メチルキサンチン類を生合成しない大腸菌が7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有していることから容易に考えることができる（本明細書の実施例を参照）。すなわち、広範囲の生物種において、キサントシンメチル化酵素遺伝子、テオブロミン合成遺伝子及びカフェイン合成遺伝子を導入し、発現させることによって、カフェイン生合成経路を再構成することができる。

【 0 0 0 9 】

本発明は以上の知見に基づいて完成されたものである。

【 0 0 1 0 】

以下、本発明を詳しく説明する。

【 0 0 1 1 】

本発明の第1のものは、下記の酵素(a) (c) (d) 及び細胞抽出物(b) の2つ以上の組み合わせの触媒作用の下に、生体外で、プリン環の7位でのキサントシンのメチル化、プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化、プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化、及び／又は、プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を行うことによって、7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 1 2 】

- (a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する酵素、
- (b) プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化を触媒する活性を有し、大腸菌から得られる細胞粗抽出物、
- (c) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：4に示すアミノ酸配列を有する酵素、
- (d) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：7に示すアミノ酸配列を有する酵素。

【 0 0 1 3 】

第1発明において、酵素(a) (c) (d) 及び細胞抽出物(b) の少なくとも1つを

これらと同等の活性を有するものと代替することもできる。

【 0 0 1 4 】

つぎに、本発明による形質転換生物系のカフェイン生合成経路の再構成法に関する第 2 ～ 8 発明について説明をする。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 2 のものは、下記の DNA 分子 (a) (b) (c) の 2 以上の組み合わせを宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法に関するものであり、より詳しくは、下記の DNA 分子 (a) (b) (c) の (a) + (b) の組み合わせ又は (a) + (b) + (c) の組み合わせを、キサントシンを生合成しかつ 7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 1 6 】

- (a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 2 に示す塩基配列を有する DNA 分子、
- (b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 5 に示す塩基配列を有する DNA 分子、
- (c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 8 に示す塩基配列を有する DNA 分子。

【 0 0 1 7 】

本発明の第 3 のものは、下記の DNA 分子 (b) と (c) の組み合わせを、7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 1 8 】

- (b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 5 に示す塩基配列を有する DNA 分子、
- (c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 8 に示す塩基配列を有する DNA 分子。

【 0 0 1 9 】

本発明の第4のものは、下記のDNA 分子(a) (b) (c) の2つ以上の組み合わせを、テオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させ、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変する方法である。

【0020】

(a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：2に示す塩基配列を有するDNA 分子、

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5に示す塩基配列を有するDNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：8に示す塩基配列を有するDNA 分子。

【0021】

第2～4発明において、DNA 分子(a) (b) (c) の少なくとも1つをこれらと同等の機能を有するもので代替することもできる。

【0022】

本発明の第5のものは、下記のRNA 分子(a) (b) (c) の2以上の組み合わせを宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法に関するものであり、より詳しくは、下記のRNA 分子(a) (b) (c) の(a) +(b) の組み合わせ又は(a) +(b) +(c) の組み合わせを、キサントシンを生合成しかつ7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【0023】

(a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：3に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：6に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9に示す塩基配列を有するRNA 分子。

【0024】

本発明の第6のものは、下記のRNA 分子(b) と(c) の組み合わせを、7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【0025】

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：6に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9に示す塩基配列を有するRNA 分子。

【0026】

本発明の第7のものは、下記のRNA 分子(a) (b) (c) の2つ以上の組み合わせを、テオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させ、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変する方法である。

【0027】

(a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：3に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(b) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：6に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9に示す塩基配列を有するRNA 分子。

【0028】

第5～7発明において、RNA 分子(a) (b) (c) の少なくとも1つをこれらと同等の機能を有するもので代替することもできる。

【0029】

本発明の第8のものは、第2～7発明において、宿主生物が植物であり、テオブロミン又はカフェインを生産又は増産することによって宿主植物を草食動物の食害から防御する、方法である。

【0030】

【発明の実施の形態】

第1発明は、無細胞系のカフェイン生合成経路の再構成法に関するものであり

、下記の酵素(a) (c) (d) 及び細胞抽出物(b) の2つ以上の組み合わせの触媒作用の下に、生体外で、プリン環の7位でのキサントシンのメチル化、プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化、プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化、及び/又は、プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を行うことによって、7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【0031】

- (a) プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する酵素、
- (b) プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化を触媒する活性を有し、大腸菌から得られる細胞粗抽出物、
- (c) プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：4に示すアミノ酸配列を有する酵素、
- (d) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する活性を有し、配列表の配列番号：7に示すアミノ酸配列を有する酵素。

【0032】

本明細書では上記キサントシンのメチル化を触媒するキサントシンメチル化酵素、7-メチルキサンチンのメチル化を触媒するテオブロミン合成酵素、及びテオブロミンのメチル化を触媒するカフェイン合成酵素をカフェイン合成系メチル化酵素と総称する。

【0033】

第1発明において、酵素(a) (c) (d) 及び細胞抽出物(b) の少なくとも1つをこれらと同等の活性を有するものと代替することもできる。例えば、コーヒーノキ由来のテオブロミン合成酵素とカフェイン合成酵素の代わりに、特開2001-37490号公報に記載されている、チャノキ由来の7-メチルキサンチン→テオブロミン→カフェインの2段階のメチル化反応を触媒するメチル化酵素を利用することができる。

【0034】

本明細書では上記の(a) 及びこれと同等のものをキサントシンメチル化酵素、

(b) 及びこれと同等のものを 7-メチルキサンチン脱リボース化酵素、(c) 及びこれと同等のものをテオブロミン合成酵素、(d) 及びこれと同等のものをカフェイン合成酵素とそれぞれ総称する。

【 0 0 3 5 】

上記の酵素及び細胞抽出物の組み合わせの例として、キサンチンからカフェインを合成するためには (a)+(b)+(c)+(d) の組み合わせ、キサンチンからテオブロミンを合成するためには (a)+(b)+(c) の組み合わせ、7-メチルキサンチンからカフェインを合成するためには (c)+(d) の組み合わせを挙げることができる。

【 0 0 3 6 】

本発明による形質転換生物系のカフェイン生合成経路の再構成法に関する第 2 発明は、下記の DNA 分子 (a) (b) (c) の (a) +(b) の組み合わせ又は (a) +(b) +(c) の組み合わせを、キサンチンを生合成しかつ 7-メチルキサンチン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 3 7 】

(a) プリン環の 7 位でのキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：2 に示す塩基配列を有する DNA 分子、
(b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5 に示す塩基配列を有する DNA 分子、
(c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：8 に示す塩基配列を有する DNA 分子。

【 0 0 3 8 】

第 2 発明において、キサンチンからカフェインを合成するためには (a)+(b) +(c) の組み合わせ、キサンチンからテオブロミンを合成するためには (a)+(b) の組み合わせが用いられる。

【 0 0 3 9 】

第 3 発明は、下記の DNA 分子 (b) と (c) の組み合わせを、7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミ

ン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 4 0 】

(b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5 に示す塩基配列を有する DNA 分子、

(c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：8 に示す塩基配列を有する DNA 分子。

【 0 0 4 1 】

第 4 発明は、下記の DNA 分子 (a) (b) (c) の 2 つ以上の組み合わせを、テオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させ、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変する方法である。

【 0 0 4 2 】

(a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：2 に示す塩基配列を有する DNA 分子、

(b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：5 に示す塩基配列を有する DNA 分子、

(c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：8 に示す塩基配列を有する DNA 分子。

【 0 0 4 3 】

第 2 ～ 4 発明において、DNA 分子 (a) (b) (c) の少なくとも 1 つをこれらと同等の機能を有するもので代替することもできる。

【 0 0 4 4 】

第 2 ～ 4 発明では、プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化、プリン環の 9 位での 7-メチルキサントシンの脱リボース化、プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化、及び／又は、プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化により、7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェインが得られる。

【 0 0 4 5 】

第 5 発明は、下記の RNA 分子 (a) (b) (c) の (a) +(b) の組み合わせ又は (a) +(b) +(c) の組み合わせを、キサントシンを生合成しかつ 7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改

変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 4 6 】

- (a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 3 に示す塩基配列を有する RNA 分子、
- (b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 6 に示す塩基配列を有する RNA 分子、
- (c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 9 に示す塩基配列を有する RNA 分子。

【 0 0 4 7 】

第 5 発明において、キサントシンからカフェインを合成するためには (a)+(b)+(c) の組み合わせ、キサントシンからテオブロミンを合成するためには (a)+(b) の組み合わせが用いられる。

【 0 0 4 8 】

第 6 発明は、下記の RNA 分子 (b) と (c) の組み合わせを、7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させ、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産する方法である。

【 0 0 4 9 】

- (b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 6 に示す塩基配列を有する RNA 分子、
- (c) プリン環の 1 位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 9 に示す塩基配列を有する RNA 分子。

【 0 0 5 0 】

第 7 発明は、下記の RNA 分子 (a) (b) (c) の 2 つ以上の組み合わせを、テオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させ、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変する方法である。

【 0 0 5 1 】

- (a) プリン環の 7 位でのキサントシンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号： 3 に示す塩基配列を有する RNA 分子、
- (b) プリン環の 3 位での 7-メチルキサンチンのメチル化を触媒する酵素をコー

とし、配列表の配列番号：6に示す塩基配列を有するRNA 分子、

(c) プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒する酵素をコードし、配列表の配列番号：9に示す塩基配列を有するRNA 分子。

【0052】

第5～7発明において、RNA 分子(a) (b) (c) の少なくとも1つをこれらと同等の機能を有するもので代替することもできる。

【0053】

第5～7発明では、プリン環の7位でのキサントシンのメチル化、プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化、プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化、及び／又は、プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化により、7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェインが得られる。

【0054】

本発明の第8のものは、第2～7発明において、宿主生物が植物であり、テオブロミン又はカフェインを生産又は増産することによって宿主植物を草食動物の食害から防御する、方法である。

【0055】

上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子は、例えば、これに特異的にハイブリダイズするオリゴ塩基をプライマーとして用いたPCR 技術（植物のPCR 実験プロトコール（細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ2）秀潤社（1995））を利用して、カフェイン生合成系メチル化酵素を生産する生物から分離することができる。

【0056】

更に、上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子は、これの全長又は一部をプローブに用いて、カフェイン生合成系メチル化酵素を生産する生物由来のcDNAライブラリー又はゲノミックライブラリーをハイブリダイゼーションスクリーニング（バイオ実験イラストレイテッド4、苦勞なしのクローニング（細胞工学別冊、目で見える実験ノートシリーズ）秀潤社（1997））することによっても分離することができる。

【0057】

この様なPCR 技術やハイブリダイゼーションスクリーニング、又は他の方法によって得られるカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子は、これの翻訳産物が目的とするメチル化酵素活性を有していれば如何なる塩基配列であってもよく、必ずしも、配列番号：2、5又は8のいずれかの塩基配列と相同性を有する必要はない。

【0058】

上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子を分離するために用いる生物は、メチルキサンチン類を生成する生物であればいずれも使用できるが、配列番号：2、5又は8のいずれかの塩基配列を有するDNA 分子、又はこれらと相同性を有するDNA 分子を分離するためには、コーヒーノキ (*Coffea*) 属植物、ツバキ (*Camellia*) 属植物、コラノキ (*Cola*) 属植物、モチノキ (*Ilex*) 属植物及びカカオノキ (*Theobroma*) 属植物などが好ましい。

【0059】

上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするRNA 分子は、Sp6 RNA プロモーターやT7プロモーターといったRNA ポリメラーゼが認識するプロモーターの下流に、上記の方法で得たカフェイン生合成系メチル化酵素DNA を連結し、これをSp6 RNA ポリメラーゼやT7 RNAポリメラーゼなどで転写させて得ることができる。また、動物又は植物ウイルスにカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 又はRNA を挿入するか、後で述べる様に適当な遺伝子発現カセットにカフェイン生合成系メチル化酵素DNA を挿入することによって組換え分子を形成し、この組換え分子を宿主生物に導入することにより、宿主生物の転写活性を利用してを得ることもできる。

【0060】

上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子又はRNA 分子から組換えタンパク質を発現、調製するためには、1) 原核細胞発現系、2) 酵母発現系、3) 植物細胞発現系、4) 昆虫細胞発現形、5) 哺乳類細胞発現系、6) In vitro 転写/ 翻訳系、などを利用することができる。

【0061】

上記の組換えタンパク質の精製試料を得るためには1) 原核細胞発現系が最も

有用であり、例えば、GST Gene Fusion System (Amersham Biosciences) を用いた場合、ベクターの構築から組換えタンパク質の発現及び精製までを全て付属の説明書に従って行うことができる。

【 0 0 6 2 】

上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子又はRNA 分子の機能を同定するためには、上記の方法で組換えタンパク質（粗抽出物又は精製物）を調製し、組換えタンパク質、メチル基受容体（キサントシン、7-メチルキサントシン又はテオブロミン）及びメチル基供与体（S-アデノシル-L-メチオニン）からなる酵素反応液をインキュベーションし、この酵素反応液中の生成物をTLC 解析又はHPLC解析する方法が行われる（本明細書の実施例を参照）。

【 0 0 6 3 】

上記のカフェイン生合成系メチル化酵素をコードするDNA 分子又はRNA 分子の複合利用によってカフェイン生合成経路を再構成できるかどうかは、上記の方法で組換えタンパク質（粗抽出物又は精製物）を調製し、2種類以上の組換えタンパク質、メチル基受容体（キサントシン又は7-メチルキサントシン）及びメチル基供与体（S-アデノシル-L-メチオニン）からなる酵素反応液をインキュベーションし、この酵素反応液中の生成物をTLC 解析又はHPLC解析することによって調べることができる（本明細書の実施例を参照）。

【 0 0 6 4 】

本発明による形質転換生物系のカフェイン生合成経路の再構成法は、1) キサントシンを生合成し、7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有する、又は2) 7-メチルキサントシンを生合成する、の何れかの条件を満たす生物種であれば宿主として利用できる。

【 0 0 6 5 】

上記の条件を満たす生物種の中でも、植物一般はメチルキサントシン類の毒性に対して比較的強く、宿主として適している。

【 0 0 6 6 】

本発明による形質転換生物系のカフェイン生合成経路の再構成法について、宿主として植物を利用した例を以下に説明する。

【 0 0 6 7 】

植物における遺伝子発現は、1) 宿主細胞内でのDNA からmRNAへの転写を可能とするプロモーター、2) プロモーターの下流にセンス方向で連結したカフェイン生合成系メチル化酵素DNA、3) 必要に応じて該DNA の下流に連結された転写産物の安定化に必要なポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列、などを含む発現カセットを植物細胞に導入して、これを形質転換する方法が利用できる。

【 0 0 6 8 】

上記の発現カセットは、挿入されているDNA を恒常的又は誘導的に発現させるためのプロモーターを含有し得る。恒常的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35S プロモーター、イネのアクチン遺伝子プロモーターなどが挙げられる。また、誘導的に発現させるためのプロモーターとしては、病原菌の感染や侵入によって活性化するイネのキチナーゼ遺伝子プロモーターやタバコのPRタンパク質遺伝子プロモーター、傷害によって活性化するタバコのWIPK遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

【 0 0 6 9 】

植物細胞の中に発現カセットを導入するためには、様々な手法を用いることができる。これらの手法には、直接導入法（パーティクルボンバードメント法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法）、形質転換因子としてアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いたT-DNA 導入法、及びその他の可能性が含まれる。

【 0 0 7 0 】

直接導入法では特別に必要とされるベクターはない。例えば、pUC 誘導体の様な単純なプラスミドを用いることができる。T-DNA 導入法ではT-DNA のボーダー配列を含有するバイナリーベクターなどを用いる必要がある。

【 0 0 7 1 】

発現カセットの導入により形質転換された植物細胞は、常法に従って再生過程を経ることにより植物組織又は植物体に変換することができる。

【 0 0 7 2 】

カフェイン生合成経路を再構成するためには、植物細胞に2種類以上の発現カセットを導入する必要がある。

【0073】

直接導入法を用いた場合、複数種類の発現カセットを含有する単一のベクター、又は、単一又は複数の発現カセットを含有する複数のベクターを植物細胞に導入することによって、カフェイン生合成経路を再構成した形質転換体を得ることができる。また、単一又は複数の発現カセットを含有する単一のベクターを植物細胞に導入し、得られた形質転換体を他の形質転換体と交配することによっても、カフェイン生合成経路を再構成した形質転換体を得ることができる。

【0074】

T-DNA 導入法を用いた場合、複数種類の発現カセットを含有する単一のT-DNAを導入することによって、カフェイン生合成経路を再構成した形質転換体を得ることができる。また、単一又は複数の発現カセットを含有する単一のT-DNA を植物細胞に導入し、得られた形質転換体を他の形質転換体と交配することによっても、カフェイン生合成経路を再構成した形質転換体を得ることができる。

【0075】

これらの方法により作出された植物体（組織や細胞を含む）又はその繁殖媒体（種子、塊茎、切穂など）から得られた植物体は、カフェイン生合成経路が再構成され、メチルキサンチン類すなわち7-メチルキサンチン、テオブロミン、カフェインのうち少なくとも一つを生成する。

【0076】

カフェイン生合成経路が再構成された植物における、メチルキサンチン類の生成量や生成比などはHPLC解析によって調べることができる。このHPLC解析は本明細書の実施例において示したものと同様の条件によって行うことができる。

【0077】

カフェイン生合成経路の再構成によってテオブロミン又はカフェインを生成する植物は、草食動物（昆虫類、ナメクジ及びカタツムリなど）に対して摂食忌避効果及び殺虫効果を有している。すなわち、この植物は農薬の効果を内在している。

【 0 0 7 8 】

【実施例】

本発明を下記の実施例により具体的に説明する。ただし、本発明の範囲は実施例に限定されるものではない。

【 0 0 7 9 】

(1) コーヒーノキ由来mRNAからの二重鎖cDNAの合成

5 g のコーヒーノキ (*Coffea arabica*) 未熟果実からCTAB法 (Chang et al., Plant Mol. Biol. Rep., 11, 113-116(1993)参照) によってtotalRNAを抽出した。100 μ gのtotalRNAからPolyAtract mRNA Isolation System III (Promega) を用いてmRNAを精製した。5 μ gのmRNAとZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene) を用いて二重鎖cDNAを合成した。

【 0 0 8 0 】

(2) CaMXMT cDNA及びCaMTL3 cDNA と相同性を有する新規cDNAの単離

CaMXMT cDNA (DDBJ/GenBank/EMBL accession number AB048794) 及びCaMTL3 cDNA (配列番号: 5、DDBJ/GenBank/EMBL accession number AB048793) の保存配列を基に設計したCaCS-N2 プライマー (5-ATGGAGCTCCAAGAAGTCCT-3) とCaCS-C1 プライマー (5-CTTTTACACGTCTGACTTCTCTG-3) を合成した。上記cDNA、上記プライマー及びPyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用いてPCR を行い、cDNA断片群を増幅した。このcDNA断片群をベクターpBluescript II KS- (Stratagene) のEcoRV サイトへ挿入し、プラスミドライブラリーを作成した。プラスミドライブラリーの中から無作為に選択したプラスミドクローンについて塩基配列決定を行い、CaMTL3 cDNA (配列番号: 2) 及びこれと高い相同性を有する新規なCaMTL4 cDNA (配列番号: 5) 及びCaMTL5 cDNA (配列番号: 8) を単離した。

【 0 0 8 1 】

(3) GST 融合タンパク質発現ベクターの構築

CaMTL3 cDNA、CaMTL4 cDNA 及びCaMTL5 cDNA をプラスミドクローンから切り出し、それぞれをpGEX-4T-2 ベクター (Amersham Biosciences) のグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子の下流に挿入した。以上の操作によって、GST とCaMTL3の融合タンパク質 (GST-MTL3) を発現させるためのpGEX-CaMTL3 ベク

ター、GST とCaMTL4の融合タンパク質 (GST-MTL4) を発現させるためのpGEX-CaMTL4 ベクター、及びGST とCaMTL5の融合タンパク質 (GST-MTL5) を発現させるためのpGEX-CaMTL5 ベクターを構築した。こうして得られたpGEX-CaMTL3 ベクター、pGEX-CaMTL4 ベクター及びpGEX-CaMTL5 ベクターを図2に模式的に示す。図2中、各ベクターは、tacプロモーター (Ptac) によって制御されるグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子 (GST) の下流に、推定メチル化酵素遺伝子 (MTL) であるCaMTL3 cDNA (配列番号: 2)、CaMTL4 cDNA (配列番号: 5) 又はCaMTL5 cDNA (配列番号: 8) を連結して構築したものである。

【 0 0 8 2 】

(4) 組換えタンパク質の生産

ベクターpGEX-4T-2、pGEX-CaMTL3、pGEX-CaMTL4 及びpGEX-CaMTL5 によって大腸菌BL21株を形質転換した。いずれの形質転換株も100mL の2×YT 液体培地 (100mg/L のアンピシリンを含む) において、培養の吸光度 (A600) が約0.7 になるまで37℃で振盪培養を行った。これらの培養に終濃度が1mM になる様にイソプロピル-β-D- チオガラクトシド (IPTG) を添加し、更に20℃で16時間、振盪培養を行った。以上の操作によって、大腸菌において組換えタンパク質 (GST、GST-MTL3、GST-MTL4及びGST-MTL5) の生産を行った。

【 0 0 8 3 】

(5) 組換えタンパク質の粗抽出と精製

組換えタンパク質を生産した大腸菌を遠心分離によって回収し、10mLの破碎洗浄液 (50mMTris-HCl [pH8.0]、1mM EDTA、5mM ジチオスレイトール) に懸濁した。以降の操作は氷上又は4℃で行った。得られた懸濁液を超音波破碎処理した後、終濃度が1%になる様にTriton X-100を加えて30分間インキュベーションした。得られた破碎液を遠心分離によって上清と沈殿に分離し、この上清を組換えタンパク質の粗抽出試料とした。粗抽出資料に100 μL のグルタチオンセファロース4B樹脂 (Amersham Biosciences) を加え、全体を30分間穏やかに攪拌した。組換えタンパク質が結合したグルタチオンセファロース4B樹脂を遠心分離によって回収し、1mL の破碎洗浄液で3回洗浄した後、同樹脂に100 μL の溶離液 (50mMTris-HCl [pH8.5]、1mM EDTA、5mM ジチオスレイトール、10mMグルタチオン)

を加えてこの混合物を15分間穏やかに攪拌した。混合物から溶出液を遠心分離によって回収し、これを組換えタンパク質の精製試料とした。粗抽出試料及び精製試料に組換えタンパク質が含まれていることをSDS-PAGE解析によって確認した。SDS-PAGE解析による組換えタンパク質の検出結果を図3に示す。

【0084】

(6) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による酵素反応生成物の同定

精製GST、粗抽出GST、精製GST-MTL3、粗抽出GST-MTL3、精製GST-MTL4、精製GST-MTL5について、以下の酵素反応実験及びTLC解析を行った。100mM Tris-HCl [pH8.0]、200 μ M $MgCl_2$ 、500 μ M 基質 (キサントシン [XR]、7-メチルキサントシン [7mX] 又はテオブロミン [Tb])、16.8 μ M S-アデノシル-L-[メチル-¹⁴C]メチオニン [SAM] [2.2GBq/mmol; Amersham Biosciences] 及び組換えタンパク質試料 (50 μ g の粗抽出試料又は5 μ g の精製試料) からなる酵素含有混合液25 μ L を27℃で16時間インキュベーションした。

【0085】

インキュベーション後の酵素反応液をフィルターカップ (ULTRAFREE-MC 10,000 NMWL; Millipore) によって濾過した。2 μ L の濾過液を2 μ L のメタノールと混合し、得られた混合液をTLC プレート (Silicagel 60 F254; Merck) に点着した。

【0086】

又はインキュベーション後の酵素反応液に250 μ L のクロロホルムを加えて全体を激しく攪拌し、クロロホルム層を回収し、濃縮乾固することによって反応生成物を精製した。この精製物を4 μ L の50% メタノールに懸濁し、TLC プレートに点着した。

【0087】

酵素反応液及びその精製物の代わりに標品として7-メチルキサントシン [7mXR]、[7mX]、[Tb]、カフェイン [Cf] 及びS-アデノシル-L-メチオニン [SAM] (それぞれ1mM 水溶液) を用いて上記と同様のTLC解析を行った。4 μ L の標品と4 μ L のメタノールの混合液をTLC プレートに点着した。

【0088】

その後、展開溶媒として水/ 酢酸/*n*- ブタノール(2:1:4, v/v/v)を用いて1.5時間展開を行った。反応生成物を展開した部分に増感剤(En³ Hance; Dupont NEN)を噴霧し、X線フィルム(BioMax MS; Kodak)を用いてオートラジオグラフィ(マイナス80℃で3日間の露光)を行い、¹⁴Cレーベル化されたメチル基が付加された酵素反応生成物のスポットを検出した。標品を展開した部分に紫外光を照射して標品のスポットを検出した。TLCによる解析の結果を図4から6に示す。

【0089】

図4から分かる様に、GST-MTL3の精製試料は、メチル基受容体である[XR]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で[7mXR]を生成した。すなわち、この試料は、[XR]のメチル化による[7mXR]の生成反応を触媒することが分かった。

【0090】

また、GST-MTL3の粗抽出試料は、メチル基受容体である[XR]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で、[7mXR]の脱リボース体である[7mX]を生成した。すなわち、この試料は、[XR]のメチル化による[7mXR]の生成、及び[7mXR]の脱リボース化による[7mX]の生成の2反応を触媒することが分かった。

【0091】

図5から分かる様に、GST-MTL4の精製試料は、メチル基受容体である[7mX]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で[Tb]を生成した。すなわち、この試料は、[7mX]のメチル化による[Tb]の生成反応を触媒することが分かった。

【0092】

更に、GST-MTL4の精製試料は、メチル基受容体であるパラキサンチン[Px]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で[Cf]を生成した。すなわち、この試料は、[Px]のメチル化による[Cf]の生成反応を触媒することが分かった。

【0093】

図6から分かる様に、GST-MTL5の精製試料は、メチル基受容体である[Tb]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で[Cf]を生成した。すなわち、この試料は、[Tb]のメチル化による[Cf]の生成反応を触媒することが分かった。

【0094】

更に、GST-MTL5の精製試料は、メチル基受容体である[7mX]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で[Tb]を生成した。すなわち、この試料は、[7mX]のメチル化による[Tb]の生成反応を触媒することが分かった。

【0095】

更に、GST-MTL5の精製試料は、メチル基受容体である[Px]及びメチル基供与体である[SAM]の存在下で[Cf]を生成した。すなわち、この試料は、[Px]のメチル化による[Cf]の生成反応を触媒することが分かった。

【0096】

対照として用いたGSTは、精製試料及び粗抽出試料ともにいずれのメチル化反応も触媒しなかった。

【0097】

以上のように、CaMTL3タンパク質、CaMTL4タンパク質及びCaMTL5タンパク質、及びこれらをコードする遺伝子群はそれぞれカフェイン生合成経路の構成要素であることが分かった。

【0098】

(7) 試験管内でのカフェイン生合成経路の再構成

100mM Tris-HCl [pH8.0]、200 μ M $MgCl_2$ 、500 μ M キサントシン [XR]、1.5mM S-アデノシル-L-メチオニン [SAM] 及び組換えタンパク質試料 (200 μ g の粗抽出試料又は20 μ g の精製試料) からなる酵素含有混合液100 μ L を27℃で16時間インキュベーションした。上記の組換えタンパク質試料は、(A) 粗抽出GST-MTL3のみ、(B) 粗抽出GST-MTL3及び精製GST-MTL4、(C) 粗抽出GST-MTL3、精製GST-MTL4及び精製GST-MTL5、の組み合わせで酵素反応に用いた。

【0099】

インキュベーション後の酵素反応液に1mL のクロロホルムを加えて全体を激しく攪拌し、クロロホルム層を回収し、濃縮乾固することによって反応生成物を精製した。この精製物を200 μ L のHPLC展開溶媒 (50mM リン酸ナトリウム [pH6.0] /メタノール [4:1, v/v]) 中に懸濁し、その内の20 μ LをHPLC解析に用いた。HPLC解析のカラムにはPuresil C18 (Waters)を用い、1mL/分の流速で懸濁液を展開した。酵素反応生成物は紫外光 (270nm) の吸光によって検出した。酵素反応生成

物の代わりに、標品として 7-メチルキサンチン [7mX]、テオブロミン [Tb]、カフェイン [Cf] を用いて上記と同様の HPLC 解析を行った。HPLC による解析の結果を図 7 に示す。

【 0 1 0 0 】

図 7-A から分かるように、GST-MTL3 の粗抽出試料は、メチル基受容体である [XR] 及びメチル基供与体である [SAM] の存在下で、[7mXR] の脱リボース体である [7mX] を生成した。すなわち、この試料は、TLC 解析と同様に HPLC 解析においても、[XR] のメチル化による [7mXR] の生成、及び [7mXR] の脱リボース化による [7mX] の生成の 2 反応を触媒することが確認された。

【 0 1 0 1 】

図 7-B から分かるように、GST-MTL3 の粗抽出試料及び GST-MTL4 の精製試料の組み合わせは、[XR] 及び [SAM] の存在下で、[7mX] 及び [Tb] を生成した。すなわち、これらの試料の組み合わせは、[XR] のメチル化による [7mXR] の生成、[7mXR] の脱リボース化による [7mX] の生成、及び [7mX] のメチル化による [Tb] の生成の 3 反応を触媒することが分かった。

【 0 1 0 2 】

図 7-C から分かるように、GST-MTL3 の粗抽出試料、GST-MTL4 の精製試料及び GST-MTL5 の精製試料の組み合わせは、[XR] 及び [SAM] の存在下で、[7mX]、[Tb] 及び [Cf] を生成した。すなわち、これらの試料の組み合わせは、[XR] のメチル化による [7mXR] の生成、[7mXR] の脱リボース化による [7mX] の生成、[7mX] のメチル化による [Tb] の生成、及び [Tb] のメチル化による [Cf] の生成の 4 反応を触媒することが分かった。

【 0 1 0 3 】

以上の様に、CaMTL3 タンパク質、CaMTL4 タンパク質、CaMTL5 タンパク質及び大腸菌の粗抽出物を複合的に利用することによって、試験管内でカフェイン生合成経路を再構成できることが分かった。

【 0 1 0 4 】

【発明の効果】

本発明によれば、下記の様な効果が発揮される。

【0105】

(1) 一連のカフェイン生合成反応系の各工程をそれぞれ触媒する複数の酵素を2以上組み合わせて用いて、生体外で、プリン環の7位でのキサントシンのメチル化、プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化、プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化、及び／又は、プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を行うことによって、7-メチルキサンチン、テオブロミン又はカフェインを生産することができる。

【0106】

(2) 一連のカフェイン生合成反応系の各工程をそれぞれ触媒する複数の酵素をコードする複数のカフェイン生合成系遺伝子を2以上組み合わせて用いて、この組み合わせをテオブロミン又はカフェインを生合成する宿主生物内で発現させることにより、テオブロミン又はカフェインの生成量を改変することができる。

【0107】

(3) 一連のカフェイン生合成反応系の各工程をそれぞれ触媒する複数の酵素をコードする複数のカフェイン生合成系遺伝子を2以上組み合わせて用いて、この組み合わせを7-メチルキサンチンを生合成する宿主生物内で発現させることにより、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産することができる。

【0108】

(4) 一連のカフェイン生合成反応系の各工程をそれぞれ触媒する複数の酵素をコードする複数のカフェイン生合成系遺伝子を2以上組み合わせて用いて、組み合わせを、キサントシンを生合成しかつ7-メチルキサントシン脱リボース化酵素活性を有する宿主生物内で発現させることにより、該宿主生物の代謝を改変してテオブロミン又はカフェインを生産することができる。

【0109】

(5) 上記(3)又は(4)の方法により、本来テオブロミン又はカフェインを生合成しない生物の代謝を改変して、これらの化合物を生産させることができる。

【0110】

(6) 上記(3)又は(4)の方法を植物において実施することによって、植物を草食

動物の食害から防御することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 はコーヒーノキ及びチャノキにおける主要なカフェイン生合成経路を示すフローシートである。構造式の下に化合物の名称を併記する。SAM は S-アデノシル-L-メチオニン、SAH は S-アデノシル-L-ホモシステインを意味する。(1) の反応はキサントシンメチル化酵素、(2) の反応は 7-メチルキサントシン脱リボース化酵素、(3) の反応は 7-メチルキサンチンメチル化酵素（テオブロミン合成酵素）、(4) の反応は 3, 7-ジメチルキサンチンメチル化酵素（カフェイン合成酵素）によって触媒される。

【図 2】 図 2 は pGEX-CaMTL3 ベクター、pGEX-CaMTL4 ベクター及び pGEX-CaMTL5 ベクターを模式的に示した図である。該ベクターは、tac プロモーター（Ptac）によって制御されるグルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子（GST）の下流に、推定メチル化酵素遺伝子（MTL）である CaMTL3 cDNA（配列番号：2）、CaMTL4 cDNA（配列番号：5）又は CaMTL5 cDNA（配列番号：8）を連結して構築したベクターである。アンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）、ラックリプレッサー遺伝子（lacI^q）、pBR322 複製起点（pBR322ori）を図中に示す。

【図 3】 図 3 は SDS-PAGE 解析による組換えタンパク質の検出を示すものである。GST の粗抽出試料、GST と CaMTL3 の融合タンパク質（GST-MTL3）の粗抽出試料（図 3 中に粗抽出試料 MTL3 で示す）、GST の精製試料、GST と CaMTL3 の融合タンパク質（GST-MTL3）の精製試料（図 3 中に精製試料 MTL3 で示す）、GST と CaMTL4 の融合タンパク質（GST-MTL4）の精製試料（図 3 中に精製試料 MTL4 で示す）、及び GST と CaMTL5 の融合タンパク質（GST-MTL5）の精製試料（図 3 中に精製試料 MTL5 で示す）を 9% ゲルによって分離した後、クーマシーブリリアントブルー染色によってタンパク質を検出した。星印は組換えタンパク質のバンドを示す。

【図 4】 図 4 は薄層クロマトグラフィー（TLC）解析による酵素反応生成物の検出を示すものである。図 3 で示した組換えタンパク質試料を用いて酵素反応を行った。左のパネルは酵素反応液を展開した後、オートラジオグラフィーによってメチル基（¹⁴C レーベル化）が付加された酵素反応生成物のスポットを検出した状態を示す。左パネルの上に酵素反応に用いたメチル基受容体を、左パ

ネルの下に酵素反応の特異的生成物を示した。右のパネルは標品を展開した後、紫外光照射によって標品のスポットを検出した状態を示す。左と右のパネルは一枚のTLC プレートを展開後、2分したものである。左と右のパネルの間に原点と移動率を示した。XRはキサントシン、7mXRは7-メチルキサントシン、7mX は7-メチルキサンチン、SAM はS-アデノシル-L- メチオニンを意味する。

【図5】 図5はTLC 解析による酵素反応生成物の検出を示すものである。図3で示した組換えタンパク質試料を用いて酵素反応を行った。左のパネルは酵素反応液を展開した後、オートラジオグラフィーによってメチル基(^{14}C レーベル化)が付加された酵素反応生成物のスポットを検出した状態を示す。左パネルの上に酵素反応に用いたメチル基受容体を、左パネルの下に酵素反応の特異的生成物を示した。右のパネルは標品を展開した後、紫外光照射によって標品のスポットを検出した状態を示す。左と右のパネルは一枚のTLC プレートを展開後、2分したものである。左と右のパネルの間に原点と移動率を示した。7mX は7-メチルキサンチン、Tbはテオブロミン、Pxはパラキサンチン、Cfはカフェイン、SAM はS-アデノシル-L- メチオニンを意味する。

【図6】 図6はTLC 解析による酵素反応生成物の検出を示すものである。図3で示した組換えタンパク質試料を用いて酵素反応を行った。左のパネルは酵素反応液又はその精製物(星印で示したレーン)を展開した後、オートラジオグラフィーによってメチル基(^{14}C レーベル化)が付加された酵素反応生成物のスポットを検出した状態を示す。左パネルの上に酵素反応に用いたメチル基受容体を、左パネルの下に酵素反応の特異的生成物を示した。右のパネルは標品を展開した後、紫外光照射によって標品のスポットを検出した状態を示す。左と右のパネルは一枚のTLC プレートを展開後、2分したものである。左と右のパネルの間に原点と移動率を示した。7mX は7-メチルキサンチン、Tbはテオブロミン、Pxはパラキサンチン、Cfはカフェイン、SAM はS-アデノシル-L- メチオニンを意味する。

【図7】 図7はHPLC解析による酵素反応生成物の検出を示すものである。図3で示した組換えタンパク質試料を用い、メチル基受容体としてキサントシンだけを用いて酵素反応を行った。(A)は粗抽出MTL3のみ、(B)は粗抽出MTL3

及び精製MTL4、(C)は粗抽出MTL3、精製MTL4及び精製MTL5を用いて行った酵素反応液のクロマトグラムを示す。(D)は標品のクロマトグラムを示す。黒抜きの矢頭は特異的生成物及び標品のピークを示す。白抜きの矢頭は夾雑物のピークを示す。7mX は 7-メチルキサンチン、Tbはテオブロミン、Cfはカフェインを意味する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NARA INSTITUTE of SCIENCE and TECHNOLOGY, KABUSHIKI KAISHA TOYOTA
CHUO KENKYUSHO

<120> Multiple use of caffeine biosynthetic genes

<130> SL-02-373

<140>

<141>

<150>

<151>

<160> 9

<170> Microsoft Word

<210> 1

<211> 372

<212> PRT

<300>

<301> Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, N., Kusano, T., and Sano, H.

<302> 7-Methylxanthine Methyltransferase of Coffee Plants. Gene Isolation and Enzymatic Properties.

<303> Journal of Biological Chemistry

<304> 276

<305> 11

<306> 8213-8218

<307> 2001-03-16

<308> BAB39215

<309> 2000-09-11

<400> 1

Met Glu Leu Gln Glu Val Leu Arg Met Asn Gly Gly Glu Gly 14

Asp Thr Ser Tyr Ala Lys Asn Ser Ala Tyr Asn Gln Leu Val 28

Leu Ala Lys Val Lys Pro Val Leu Glu Gln Cys Val Arg Glu 42

Leu Leu Arg Ala Asn Leu Pro Asn Ile Asn Lys Cys Ile Lys 56

Val Ala Asp Leu Gly Cys Ala Ser Gly Pro Asn Thr Leu Leu 70

Thr Val Arg Asp Ile Val Gln Ser Ile Asp Lys Val Gly Gln 84

Glu Lys Lys Asn Glu Leu Glu Arg Pro Thr Ile Gln Ile Phe 98

Leu Asn Asp Leu Phe Pro Asn Asp Phe Asn Ser Val Phe Lys 112

Leu Leu Pro Ser Phe Tyr Arg Lys Leu Glu Lys Glu Asn Gly	126
Arg Lys Ile Gly Ser Cys Leu Ile Gly Ala Met Pro Gly Ser	140
Phe Tyr Ser Arg Leu Phe Pro Glu Glu Ser Met His Phe Leu	154
His Ser Cys Tyr Cys Leu Gln Trp Leu Ser Gln Val Pro Ser	168
Gly Leu Val Thr Glu Leu Gly Ile Ser Thr Asn Lys Gly Ser	182
Ile Tyr Ser Ser Lys Ala Ser Arg Leu Pro Val Gln Lys Ala	196
Tyr Leu Asp Gln Phe Thr Lys Asp Phe Thr Thr Phe Leu Arg	210
Ile His Ser Glu Glu Leu Phe Ser His Gly Arg Met Leu Leu	224
Thr Cys Ile Cys Lys Gly Val Glu Leu Asp Ala Arg Asn Ala	238
Ile Asp Leu Leu Glu Met Ala Ile Asn Asp Leu Val Val Glu	252
Gly His Leu Glu Glu Glu Lys Leu Asp Ser Phe Asn Leu Pro	266
Val Tyr Ile Pro Ser Ala Glu Glu Val Lys Cys Ile Val Glu	280
Glu Glu Gly Ser Phe Glu Ile Leu Tyr Leu Glu Thr Phe Lys	294
Val Leu Tyr Asp Ala Gly Phe Ser Ile Asp Asp Glu His Ile	308

Lys Ala Glu Tyr Val Ala Ser Ser Val Arg Ala Val Tyr Glu 322

Pro Ile Leu Ala Ser His Phe Gly Glu Ala Ile Ile Pro Asp 336

Ile Phe His Arg Phe Ala Lys His Ala Ala Lys Val Leu Pro 350

Leu Gly Lys Gly Phe Tyr Asn Asn Leu Ile Ile Ser Leu Ala 364

Lys Lys Pro Glu Lys Ser Asp Val 372

<210> 2

<211> 1316

<212> DNA

<213> Coffea arabica

<220>

<221> CDS

<222> (45) ...och(1163)

<300>

<308> AB048793

<309> 2000-09-11

<400> 2

ctttggcagt cccaatttga tttatgtaca agtcctgcat atgaatggag 50

ctccaagaag tcctgcggat gaatggaggc gaaggcgata caagctacgc 100

caagaattca gcctacaatc aactggttct cgccaagggtg aaacctgtcc 150

ttgaacaatg cgtacgggaa ttgttgcgga ccaacttgcc caacatcaac	200
aagtgcatta aagttgcgga tttgggatgc gcttctggac caaacacact	250
tttaacagtt cgggacattg tccaaagtat tgacaaagtt ggccaggaaa	300
agaagaatga attagaacgt cccaccattc agatttttct gaatgatctt	350
ttcccaaagt atttcaattc ggttttcaag ttgctgcca gcttctaccg	400
caaacttgag aaagaaaatg gacgcaaaat aggatcgtgc ctaatagggg	450
caatgcccgg ctctttctac agcagactct tccccgagga gtccatgcat	500
tttttacact cttgttactg tcttcaatgg ttatctcagg ttcctagcgg	550
tttggtgact gaattgggga tcagtacgaa caaagggagc atttactctt	600
ccaaagcaag tcgtctgccc gtccagaagg catatttgga tcaatttacg	650
aaagatttta ccacatttct aaggattcat tcggaagagt tgttttcaca	700
tggccgaatg ctccttactt gcatttgtaa aggagttgaa ttagacgccc	750
ggaatgccat agacttactt gagatggcaa taaacgactt ggttgttgag	800
ggacatctgg aggaagaaaa attggatagt ttcaatcttc cagtctatat	850

accttcagca gaagaagtaa agtgcatagt tgaggaggaa ggttcttttg	900
aaatattata cctggagact tttaagggtcc tttagatgc tggcttctct	950
attgacgatg aacatattaa agcagagtat gttgcatctt ccgttagagc	1000
agttttacgaa cccatcctcg caagtcattt tggagaagct attatacctg	1050
acatattcca caggtttgcg aagcatgcag caaaggttct ccccttgggc	1100
aaaggcttct ataataatct tatcatttct ctgccaaaa agccagagaa	1150
gtcagacgtg taaaagtttg tttttgtgtt ggggaaagga ataagtgccg	1200
ttgggggtct ttcgggtatt gtgcttttta tattatattg ttttgtatcc	1250
gtaataaaaag tgggtgtgtaa gaataagata ttgacatat attattttca	1300
aaaaaaaaaa aaaaaa	1316

<210> 3

<211> 1316

<212> RNA

<213> Coffea arabica

<220>

<221> CDS

<222> (45) ...och(1163)

<300>

<308> AB048793

<309> 2000-09-11

<400> 3

cuuuggcagu cccaauuuga uuuauguaca aguccugcau augauggag	50
cuccaagaag uccugcggau gaauggaggc gaaggcgaua caagcuacgc	100
caagaauuca gccuacaau c acugguucu cgccaaggug aaaccugucc	150
uugaacaau cguacgggaa uuguugcggg ccaacuugcc caacaucaac	200
aagugcauu aaguugcgga uuugggaugc gcuucuggac caaacacacu	250
uuuaacaguu cgggacauug uccaaaguau ugacaaaguu ggccaggaaa	300
agaagauga auuagaacgu cccaccuuc agauuuuucu gaaugaucuu	350
uucccaaaug auuucuuuc gguuuucaag uugcugccaa gcuucuaccg	400
caaacuugag aaagaaaug gacgcaaaau aggaucgugc cuaauagggg	450
caaugcccgg cucuuucuac agcagacucu uccccgagga guccaugcau	500
uuuuuacacu cuuguuacug ucuucaaugg uuauucagagg uuccuagcgg	550
uuuggugacu gaauugggga ucaguacgaa caaagggagc auuuacucuu	600

ccaaagcaag ucgucugccc guccagaagg cauauuugga ucaauuuacg	650
aaagauuuua ccacauuucu aaggauucau ucggaagagu uguuuucaca	700
uggccgaaug cuccuuacuu gcauuuguaa aggaguugaa uuagacgccc	750
ggaaugccau agacuuacuu gagauggcaa uaaacgacuu gguuguugag	800
ggacaucugg aggaagaaaa auuggauagu uucaaucuuc cagucuauau	850
accuucagca gaagaagua agugcauagu ugaggaggaa gguucuuuug	900
aaaauuuaua ccuggagacu uuuuaggucc uuucgaugc ugguucucu	950
auugacgaug aacauauuaa agcagaguau guugcaucu ccguuagagc	1000
aguuuacgaa cccauccucg caagucuuu uggagaagcu auuauaccug	1050
acauauucca cagguuugcg aagcaugcag caaagguucu ccccuugggc	1100
aaaggcuucu auaauaaucu uaucauuucu cucgccaaaa agccagagaa	1150
gucagacgug uaaaaguug uuuuuguguu ggggaaagga auaagugccg	1200
uugggggucu uucggguauu gugcuuuua uauuauauug uuuuguauc	1250
guaauaaaag ugguguguaa gaauaagaua uuugacauau auuauuuca	1300
aaaaaaaaa aaaaaa	1316

<210> 4

<211>

<212> PRT

<213> Coffea arabica

<400> 4

Met Glu Leu Gln Glu Val Leu His Met Asn Glu Gly Glu Gly	14
Asp Thr Ser Tyr Ala Lys Asn Ala Ser Tyr Asn Leu Ala Leu	28
Ala Lys Val Lys Pro Phe Leu Glu Gln Cys Ile Arg Glu Leu	42
Leu Arg Ala Asn Leu Pro Asn Ile Asn Lys Cys Ile Lys Val	56
Ala Asp Leu Gly Cys Ala Ser Gly Pro Asn Thr Leu Leu Thr	70
Val Arg Asp Ile Val Gln Ser Ile Asp Lys Val Gly Gln Glu	84
Glu Lys Asn Glu Leu Glu Arg Pro Thr Ile Gln Ile Phe Leu	98
Asn Asp Leu Phe Gln Asn Asp Phe Asn Ser Val Phe Lys Leu	112
Leu Pro Ser Phe Tyr Arg Lys Leu Glu Lys Glu Asn Gly Arg	126
Lys Ile Gly Ser Cys Leu Ile Ser Ala Met Pro Gly Ser Phe	140
Tyr Gly Arg Leu Phe Pro Glu Glu Ser Met His Phe Leu His	154

Ser Cys Tyr Ser Val His Trp Leu Ser Gln Val Pro Ser Gly	168
Leu Val Ile Glu Leu Gly Ile Gly Ala Asn Lys Gly Ser Ile	182
Tyr Ser Ser Lys Ala Ser Arg Pro Pro Val Gln Lys Ala Tyr	196
Leu Asp Gln Phe Thr Lys Asp Phe Thr Thr Phe Leu Arg Ile	210
His Ser Lys Glu Leu Phe Ser Arg Gly Arg Met Leu Leu Thr	224
Cys Ile Cys Lys Val Asp Glu Tyr Asp Glu Pro Asn Pro Leu	238
Asp Leu Leu Asp Met Ala Ile Asn Asp Leu Ile Val Glu Gly	252
His Leu Glu Glu Glu Lys Leu Ala Ser Phe Asn Leu Pro Phe	266
Phe Thr Pro Ser Ala Glu Glu Val Lys Cys Ile Val Glu Glu	280
Glu Gly Ser Phe Glu Ile Leu Tyr Leu Glu Thr Phe Lys Ala	294
His Tyr Asp Ala Gly Phe Ser Ile Asp Asp Asp Tyr Pro Val	308
Arg Ser His Phe Gln Val Tyr Gly Asp Glu His Ile Lys Ala	322
Glu Tyr Val Ala Ser Leu Ile Arg Ser Val Tyr Glu Pro Ile	336
Leu Ala Ser His Phe Gly Glu Ala Ile Met Pro Asp Leu Phe	350
His Arg Leu Ala Lys His Ala Ala Lys Val Leu His Leu Gly	364

Lys Gly Cys Tyr Asn Asn Leu Ile Ile Ser Leu Ala Lys Lys 378

Pro Glu Lys Ser Asp Val 384

<210> 5

<211> 1155

<212> DNA

<213> Coffea arabica

<220>

<221> CDS

<222> (1) ...och(1152)

<400> 5

atggagctcc aagaagtcct gcatatgaat gaaggtgaag gcgatacaag 50

ctacgccaaag aatgcatcct acaatctggc tcttgccaag gtgaaacctt 100

tccttgaaca atgcatacga gaattgttgc gggccaactt gcccaacatc 150

aacaagtgc ttaaagttgc ggatttggga tgcgcttctg gaccaaacac 200

acttttaaca gtgcgggaca ttgtgcaaag tattgacaaa gttggccagg 250

aagagaagaa tgaattagaa cgtcccacca ttcagatttt tctgaatgat 300

cttttccaaa atgatttcaa ttcggttttc aagttgctgc caagcttcta 350

ccgcaaactc gagaaagaaa atggacgcaa gataggatcg tgcctaataa	400
gcgcaatgcc tggctctttc tacggcagac tcttccccga ggagtccatg	450
cattttttgc actcttggtta cagtgttcat tggttatctc aggttcccag	500
cggtttggtg attgaattgg ggattggtgc aaacaaaggg agtatttact	550
cttccaaagc aagtcgtccg cccgtccaga aggcatattt ggatcaattt	600
acgaaagatt ttaccacatt tctaaggatt cattcgaaag agttgttttc	650
acgtggccga atgctcctta ctigcatttg taaagtagat gaatacgacg	700
aaccgaatcc cctagactta ctigacatgg caataaacga ctigattggt	750
gagggacatc tggaggaaga aaaattggct agtttcaatc ttccattctt	800
tacaccttca gcagaagaag taaagtgcac agttgaggag gaaggttctt	850
ttgaaatttt atacctggag acttttaagg ccattatga tgctggcttc	900
tctattgatg atgattaccc agtaagatcc catttccaag tatacggcga	950
tgaacatatt aaagcagagt atgtggcatc attaattaga tcagtttacg	1000
aaccatcct cgcaagtcac ttgggagaag ctattatgcc tgacttatc	1050
cacaggcttg cgaagcatgc agcaaagggtt ctccacttgg gcaaaggctg	1100

ctataataat cttatcattt ctctcgccaa aaagccagag aagtcagacg 1150

tgtaa 1155

<210> 6

<211> 1155

<212> RNA

<213> Coffea arabica

<220>

<221> CDS

<222> (1) ...och(1152)

<400> 6

auggagcucc aagaaguccu gcauaugaau gaaggugaag gcgauacaag 50

cuacgccaaag aaugcauccu acaaucuggc ucuugccaag gugaaaccuu 100

uccuugaaca augcauacga gaauuguugc gggccaacuu gccaacauc 150

aacaagugca uuaaaguugc ggauuuggga ugcgcuucug gaccaaacac 200

acuuuuuaca gugcgggaca uugugcaaag uauugacaaa guuggccagg 250

aagagaagaa ugaauuagaa cgucccacca uucagauuuu ucugaaugau 300

cuuuuccaaa augauuucaa uucgguuuuc aaguugcugc caagcuucua 350

ccgcaaacuc gagaaagaaa auggacgcaa gauaggauugc ugccuaauaa	400
gcgcaaugcc uggcucuuc uacggcagac ucuuccccga ggaguccaug	450
cauuuuuugc acucuuguua caguguucau ugguuauuc agguucccag	500
cgguuuggug auugaauugg ggauuggugc aaacaaagg aguuuuacu	550
cuuccaaagc aagucguccg cccguccaga aggcauuuu ggaucauuu	600
acgaaagauu uuaccacauu ucuaaggauu cauucgaaag aguuguuuuc	650
acguggccga augcuccua cuugcauuug uaaaguagau gaauacgacg	700
aaccgaaucc ccuagacuua cuugacaugg caauaaacga cuugauuguu	750
gagggacauc uggaggaaga aaaaauuggcu aguuucaauc uuccauucuu	800
uacaccuuca gcagaagaag uaaagugcau aguugaggag gaagguucuu	850
uugaaaauuu auaccuggag acuuuuuagg ccuauuuga ugcuggcuuc	900
ucuauugaug augauuaccc aguaagauc cauuuccaag uauacggcga	950
ugaacauuu aaagcagagu auguggcauc auuaauuaga ucaguuuacg	1000
aaccuuccu cgcaagucuu uuuggagaag cuuuuauugc ugacuuauc	1050
cacaggcuug cgaagcaugc agcaaagguu cuccacuugg gcaaaggcug	1100

cuauaauaau cuuaucauuu cucucgccaa aaagccagag aagucagacg	1150
uguaa	1155
<210> 7	
<211> 384	
<212> PRT	
<213> Coffea arabica	
<400> 7	
Met Glu Leu Gln Glu Val Leu His Met Asn Gly Gly Glu Gly	14
Asp Thr Ser Tyr Ala Lys Asn Ser Phe Tyr Asn Leu Phe Leu	28
Ile Arg Val Lys Pro Ile Leu Glu Gln Cys Ile Gln Glu Leu	42
Leu Arg Ala Asn Leu Pro Asn Ile Asn Lys Cys Ile Lys Val	56
Ala Asp Leu Gly Cys Ala Ser Gly Pro Asn Thr Leu Leu Thr	70
Val Arg Asp Ile Val Gln Ser Ile Asp Lys Val Gly Gln Glu	84
Lys Lys Asn Glu Leu Glu Arg Pro Thr Ile Gln Ile Phe Leu	98
Asn Asp Leu Phe Gln Asn Asp Phe Asn Ser Val Phe Lys Ser	112
Leu Pro Ser Phe Tyr Arg Lys Leu Glu Lys Glu Asn Gly Arg	126

Lys Ile Gly Ser Cys Leu Ile Gly Ala Met Pro Gly Ser Phe	140
Tyr Gly Arg Leu Phe Pro Glu Glu Ser Met His Phe Leu His	154
Ser Cys Tyr Cys Leu His Trp Leu Ser Gln Val Pro Ser Gly	168
Leu Val Thr Glu Leu Gly Ile Ser Ala Asn Lys Gly Cys Ile	182
Tyr Ser Ser Lys Ala Ser Arg Pro Pro Ile Gln Lys Ala Tyr	196
Leu Asp Gln Phe Thr Lys Asp Phe Thr Thr Phe Leu Arg Ile	210
His Ser Glu Glu Leu Ile Ser Arg Gly Arg Met Leu Leu Thr	224
Trp Ile Cys Lys Glu Asp Glu Phe Glu Asn Pro Asn Ser Ile	238
Asp Leu Leu Glu Met Ser Ile Asn Asp Leu Val Ile Glu Gly	252
His Leu Glu Glu Glu Lys Leu Asp Ser Phe Asn Val Pro Ile	266
Tyr Ala Pro Ser Thr Glu Glu Val Lys Cys Ile Val Glu Glu	280
Glu Gly Ser Phe Glu Ile Leu Tyr Leu Glu Thr Phe Lys Val	294
Pro Tyr Asp Ala Gly Phe Ser Ile Asp Asp Asp Tyr Gln Gly	308
Arg Ser His Ser Pro Val Ser Cys Asp Glu His Ala Arg Ala	322
Ala His Val Ala Ser Val Val Arg Ser Ile Phe Glu Pro Ile	336

Val Ala Ser His Phe Gly Glu Ala Ile Met Pro Asp Leu Ser 350

His Arg Ile Ala Lys Asn Ala Ala Lys Val Leu Arg Ser Gly 364

Lys Gly Phe Tyr Asp Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Lys Lys 378

Pro Glu Lys Ser Asp Val 384

<210> 8

<211> 1155

<212> DNA

<213> Coffea arabica

<220>

<221> CDS

<222> (1) ...och(1152)

<400> 8

atggagctcc aagaagtcct gcatatgaat ggaggcgaag gcgatacaag 50

ctacgccaaag aactcattct acaatctggt tctcatcagg gtgaaaccta 100

tccttgaaca atgcatacaa gaattgttgc gggccaactt gcccaacatc 150

aacaagtgc ttaaagttgc ggatttggga tgcgttctg gaccaaacac 200

acttttaaca gttcgggaca ttgtacaaag tattgacaaa gttggccagg 250

aaaagaagaa tgaattagaa cgtcccacca ttcagat ttt tctgaatgat	300
cttttccaaa atgatttcaa ttcggttttc aagtcgctgc caagcttcta	350
ccgcaaactt gagaaagaaa atggacgcaa aataggatca tgcctgatag	400
gcgcaatgcc tggctctttc tacggcagac tcttccccga ggagtccatg	450
cattttttac actcttgta ctgtttgcat tggttatctc aggttcccag	500
cggtttggtg actgaattgg ggatcagtc gaacaaagg tgcatttact	550
cttccaaagc aagtcgtccg cccatccaga aggcatattt ggatcaattt	600
acgaaagatt ttaccacatt tcttaggatt cattcggaag agttgatttc	650
acgtggccga atgctcctta cttggatttg caaagaagat gaattcgaga	700
accgaattc catagactta cttgagatgt caataaacga cttggttatt	750
gagggacatc tggaggaaga aaaattggac agtttcaatg ttccaatcta	800
tgcaccttca acagaagaag taaagtgc at agttgaggag gaaggttctt	850
ttgaaatttt atacctggag acttttaagg tcccttatga tgctggcttc	900
tctattgatg atgattacca aggaagatcc cattccccag tctcctgcga	950
tgaacatgct agagcagcgc atgtggcatc tgtcgtaga tcaattttcg	1000

aacccatcgt cgcaagtcac tttaggagaag ctatcatgcc tgacttatcc 1050

cacaggattg cgaagaatgc agcaaagggtt cttcgctccg gcaaaggctt 1100

ctatgatagt cttatcattt ctctcgccaa aaagccagag aagtcagacg 1150

tgtaa 1155

<210> 9

<211> 1155

<212> RNA

<213> Coffea arabica

<220>

<221> CDS

<222> (1) ...och(1152)

<400> 9

auggagcucc aagaaguccu gcauugaau ggaggcgaag gcgauacaag 50

cuacgccaaag aacucauucu acaaucuguu ucucaucagg gugaaaccua 100

uccuugaaca augcauacaa gaauuguugc gggccaacuu gcccaaacac 150

aacaagugca uuaaaguugc ggauuuggga ugcgcucucug gaccaaacac 200

acuuuuuaca guucgggaca uuguacaaag uauugacaaa guuggccagg 250

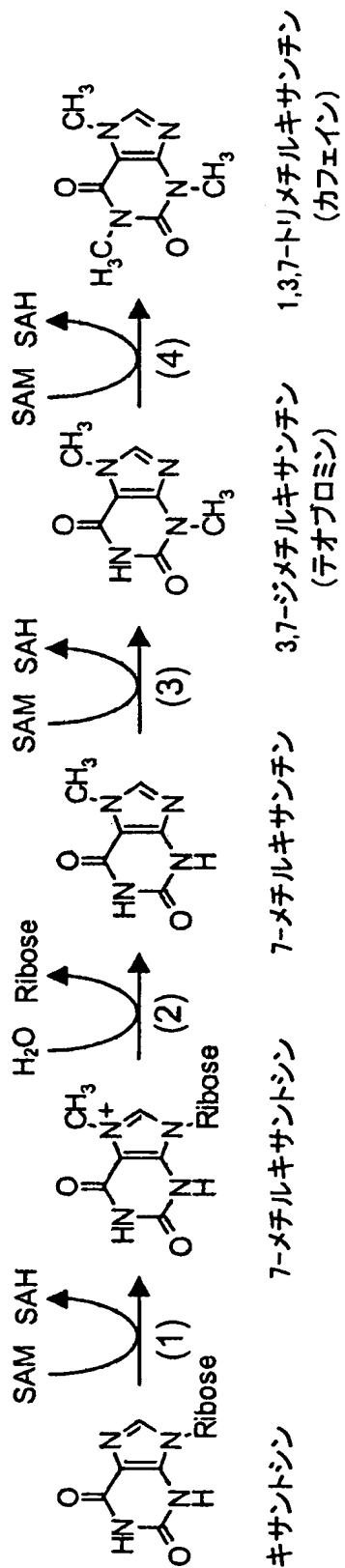
aaaagaagaa ugaauuagaa cgucccacca uucagauuuu ucugaaugau	300
cuuuuccaaa augauuucaa uucgguuuuc aagucgcugc caagcuucua	350
ccgcaaacu gagaagaaa auggacgcaa aaugagauca ugccugauag	400
gcgcaaugcc uggcucuuc uacggcagac ucuuccccga ggaguccaug	450
cauuuuuuac acucuuguua cuguuugcau ugguuauuc agguucccag	500
cgguuuggug acugaauugg ggaucagugc gaacaaagg ugcauuuacu	550
cuuccaaagc aagucguccg cccauccaga aggcauuuu ggaucaauuu	600
acgaaagauu uuaccacauu ucuuaggauu cauucggaag aguugauuuc	650
acguggccga augcuccua cuuggauuug caaagaagau gaaucgaga	700
acccgaauc cauagacuua cuugagaugu caauaaacga cuugguuuu	750
gagggacauc uggaggaaga aaaauggac aguuucaug uuccaauca	800
ugcaccuua acagaagaag uaaagugcau aguugaggag gaagguucu	850
uugaaaauu auaccuggag acuuuuuagg ucccuuuga ugcuggcuuc	900
ucuauugaug augauuacca aggaagauc cauuccccag uauccugcga	950
ugaacaugcu agagcagcgc auguggcauc ugucguuaga ucauuuuucg	1000

aacccaucgu cgcaagucan uuuggagaag cuaucaugcc ugacuuaucc	1050
cacaggauug cgaagaauuc agcaaagguu cuucgcuccg gcaaaggcuu	1100
cuaugauagu cuuaucauuu cucucgcaa aaagccagag aagucagacg	1150
uguaa	1155

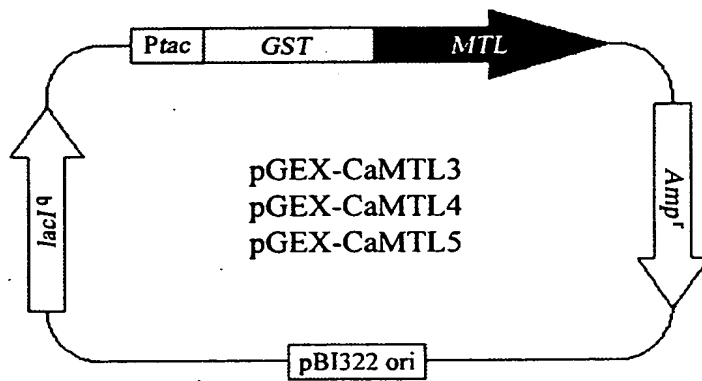
特 2 0 0 2 - 2 1 3 6 5 5

【書類名】 図面

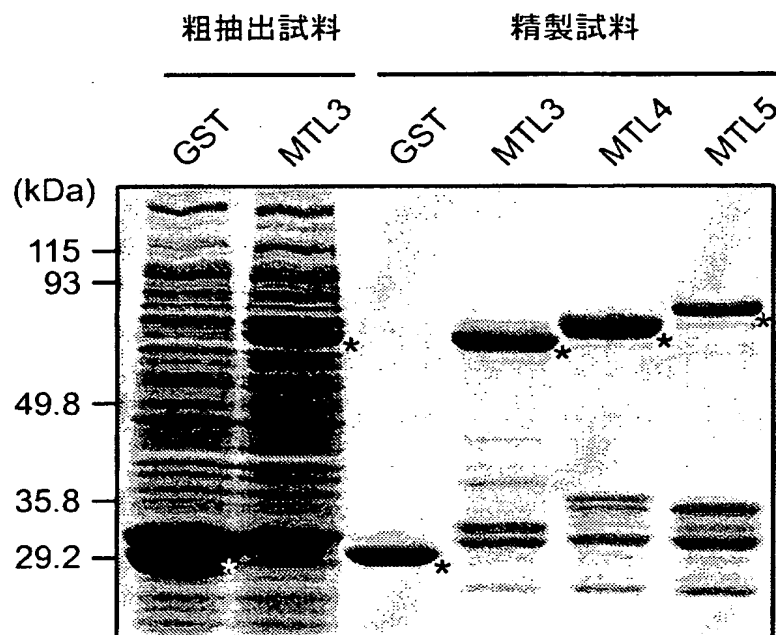
【図 1】



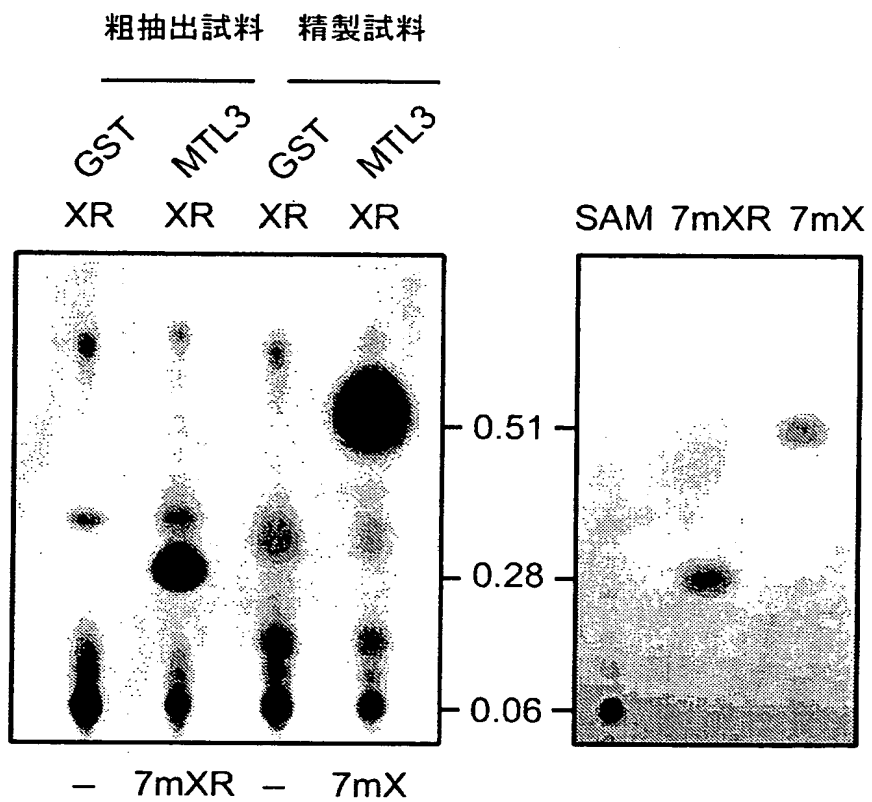
【図 2】



【図 3】

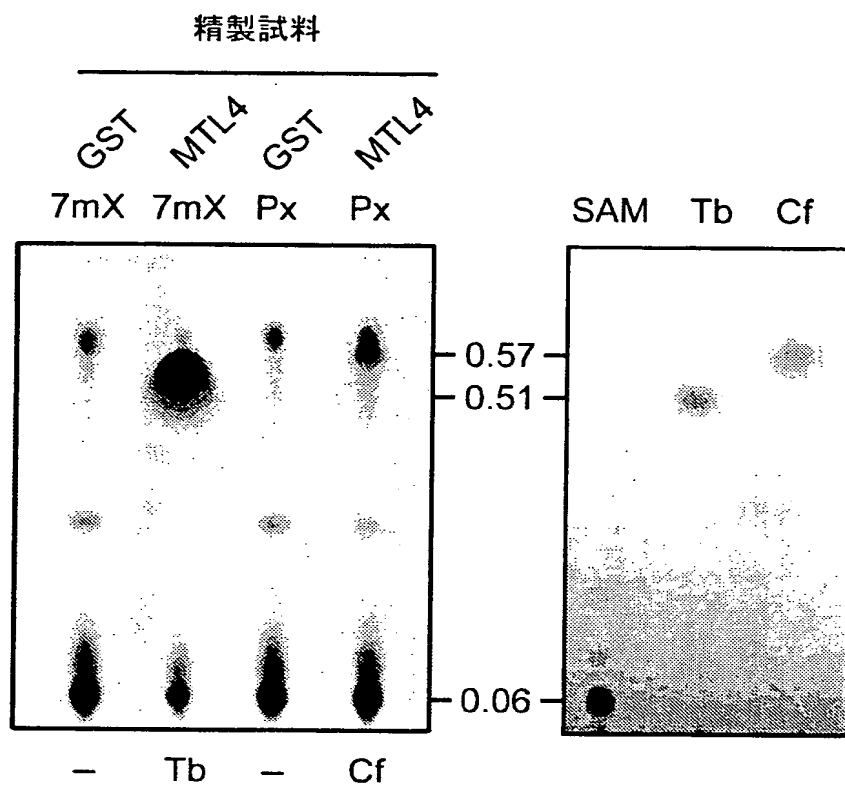


【図 4】

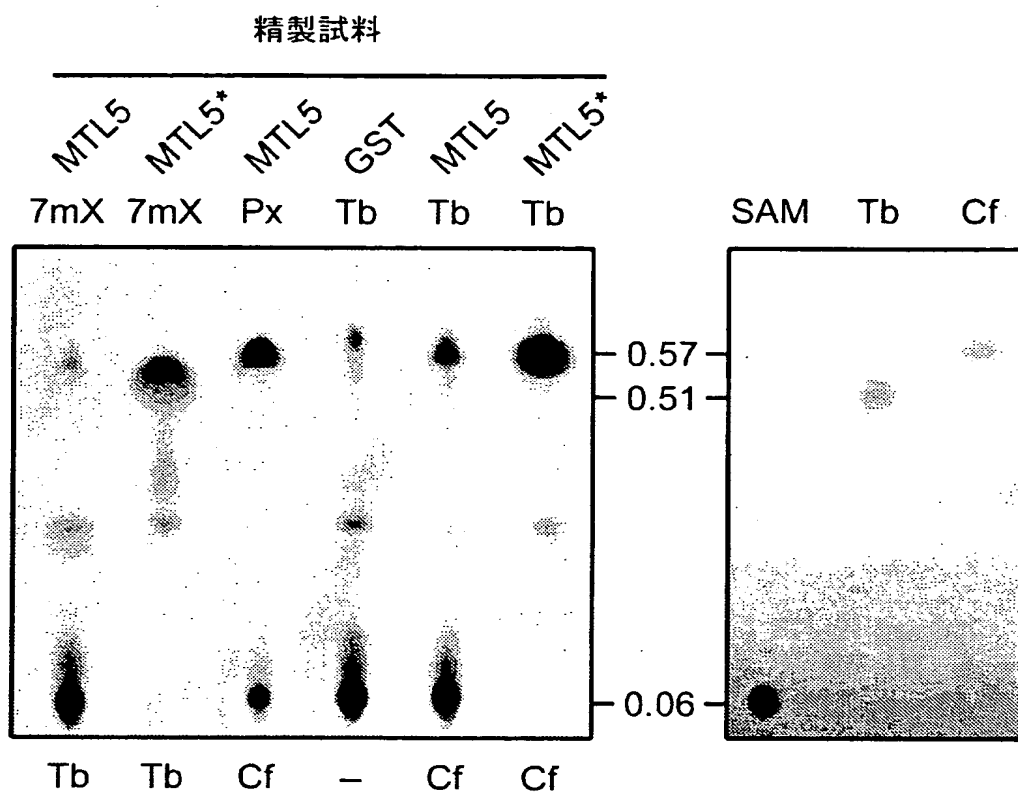




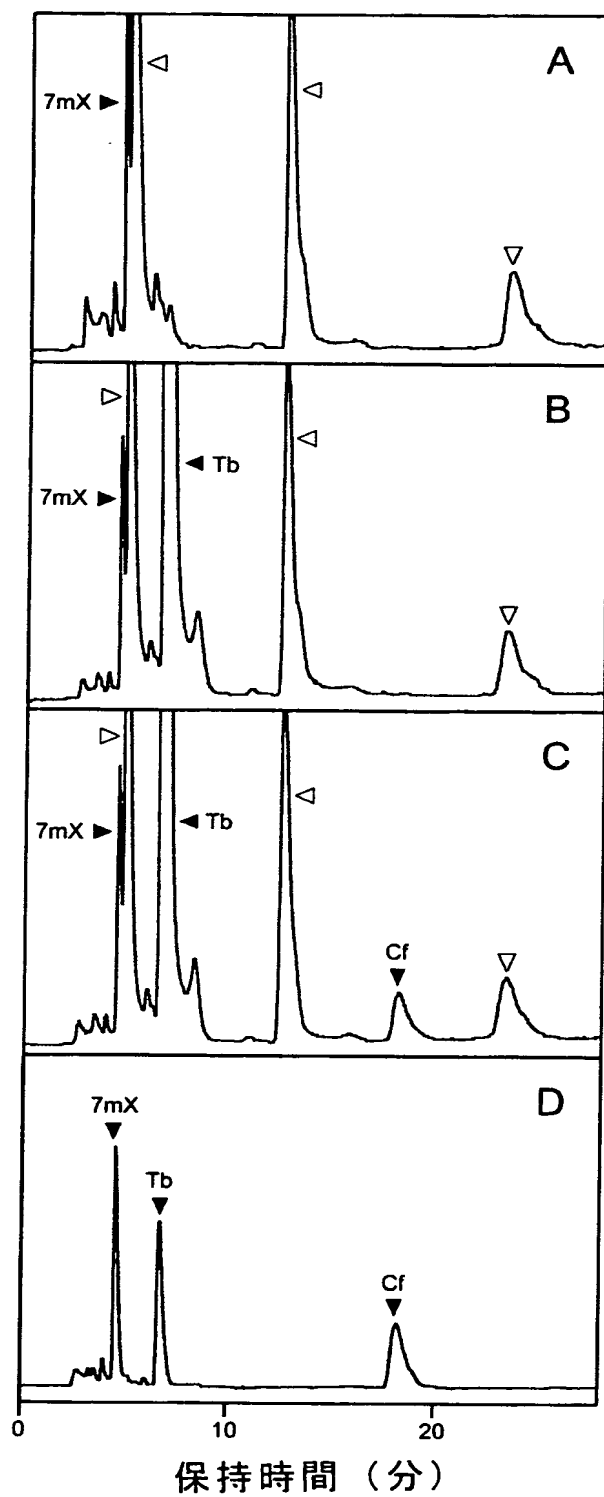
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カフェイン生合成反応系にて、これらの反応をそれぞれ触媒する酵素、及びこれら酵素をそれぞれコードする遺伝子の複合的な利用方法を提供する。

【解決手段】 酵素a.c.d.及び細胞抽出物b.の2つ以上の組合せの下に、生体外で、キサントシンのメチル化、7-メチルキサントシンの脱リボース化、7-メチルキサンチンのメチル化及び／又はテオブロミンのメチル化を行うことによって、7-メチルキサンチン、テオブロミンまたはカフェインを生産する方法である。a.プリン環の7位でのキサントシンのメチル化を触媒し配列1に示すアミノ酸配列を有する酵素、b.プリン環の9位での7-メチルキサントシンの脱リボース化を触媒し、大腸菌から得られる細胞粗抽出物、c.プリン環の3位での7-メチルキサンチンのメチル化を触媒し配列4に示すアミノ酸配列を有する酵素、d.プリン環の1位でのテオブロミンのメチル化を触媒し配列7に示すアミノ酸配列を有する酵素。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 8 1 6 9 4 5 7]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 1 2 月 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5
氏 名	奈良先端科学技術大学院大学長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003609]

1. 変更年月日 1990年 9月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1
氏 名 株式会社豊田中央研究所